

〔研究室紹介〕

発酵食品学研究室
Laboratory of Fermented Foods佐々木 泰 子
Yasuko SASAKI

□ はじめに

当研究室は、発酵食品製造に関与する“乳酸菌”の研究を行なっている。乳酸菌は実に多くの発酵食品に利用されており、味噌・しょうゆ・日本酒・ワイン・ウイスキーなどのスターターとして、他の微生物（麹菌や酵母など）と連携しながら製造工程はもとより、味や風味、その保存性に寄与している。当研究室では、ヨーグルトやチーズ、そして漬物の製造に関わる数種類の乳酸菌と、腸管内でプロバイオティクスとして働く乳酸菌、植物葉上で生育している乳酸菌などの多様な乳酸菌を研究対象としており、その発酵特性・細胞外多糖生産や胃酸・胆汁酸・低温・酸素に対するストレス応答現象を調べ、それらの遺伝子レベルでの解析を目指している。現在4社の委託研究を行っており、実際に食品製造に用いられている乳酸菌の基礎研究に取り組んでいる。ここではヨーグルト製造を担う乳酸菌の共生発酵について我々の研究を紹介したい。

ヨーグルトは世界中で愛されている食品であり、その歴史は古く紀元前5000～6000年頃に遡るとされる。市場には数多くのヨーグルトが並ぶが、プロバイオティクスなどの機能性ヨーグルトの多くは機能性を持つ乳酸菌・ビフィズス菌などをヨーグルトに添加した形で作られており、その土台となるヨーグルトは基本的に2種の乳酸菌すなわち乳酸桿菌 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*) と乳酸球菌 *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*) の共生発酵によって作られる。

これら2種の乳酸菌を単菌でミルクに植えるとミ

ルクが固まるまでに長時間を要するが、共培養することでその発酵時間^{注*}は数分の1に短縮される。さらに共生による代謝変化により特有の揮発成分（いわゆるヨーグルトの風味）や細胞外多糖の生産も増加する。図1に示すように、球菌の *S. thermophilus* はミルクトタンパクの80%を占めるカゼインを分解できるプロテアーゼを持たず、桿菌 *L. bulgaricus* が所持する PrtB プロテアーゼによって分解されるペプチドやアミノ酸を窒素源としている一方、*L. bulgaricus* は *S. thermophilus* が産生するギ酸を生育因子として要求する。しかし株の組合せによって共生による発酵促進が認められない場合もあり、共生の成立に関して未解明な部分は多く、未知の共生因子の探索が求められ

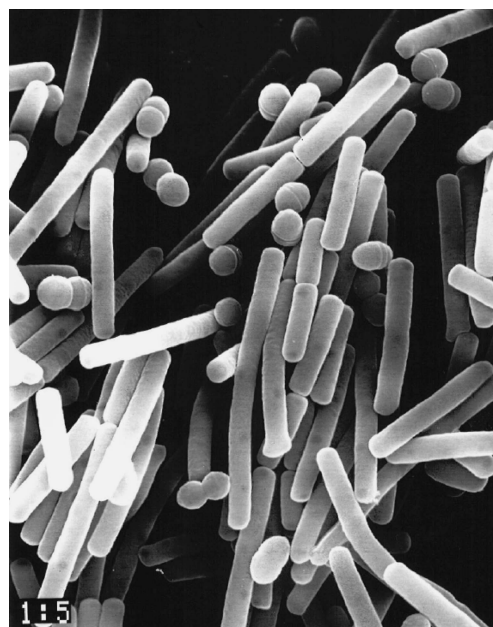


図1 ヨーグルト発酵を担う2種の乳酸菌：
Lactobacillus bulgaricus & *Streptococcus thermophilus*

注* 滴定酸度0.7%に達する時間を発酵時間とする

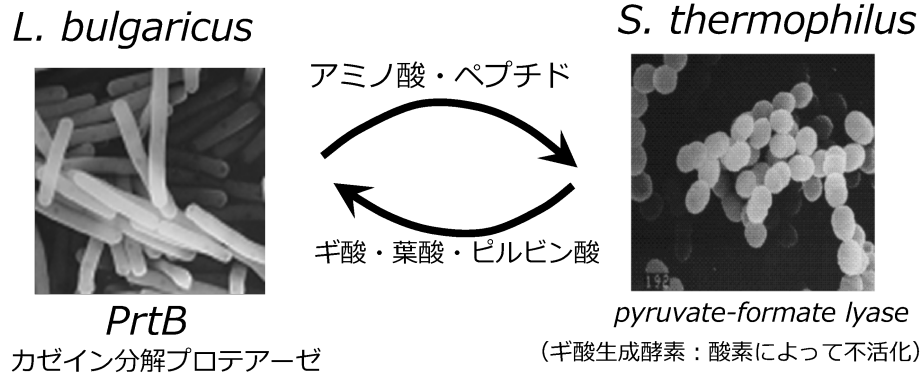


図2 2つの菌株間の代謝物の「相補」

ている。

□ 新規な共生因子の発見：NADH oxidase

我々はヨーグルト発酵が始まるためには、当初約7 mg/kg 存在するミルク中の溶存酸素がゼロ近くに減少することが必要であることを見出した¹⁾。両菌ともに通性嫌気性菌であり酸素によって不活化される酵素を所持するため、増殖すなわち乳酸生産が活発化するためには菌自らが溶存酸素を0近くまで消費することが必要であると推定された。特に *L. bulgaricus* の生育促進因子でもあるギ酸はプリン骨格の原料として両菌の増殖に必須であるが、その生産酵素 *S. thermophilus* の pyruvate formate lyase は酸素によって不活化される。実際ジャーを用いた実験でミルク中の溶存酸素濃度を4 mg/kg に固定すると、ギ酸は全く生産されずヨーグルト発酵は著しく阻害された²⁾。両菌はともに溶存酸素消費能力を有するが、*L. bulgaricus* は酸素を過酸化水素に変換、一方 *S. thermophilus* は水に変換と、両菌でそのメカニズムが大きく異なることが判明した。共生では過酸化水素が殆ど検出されないことから *S. thermophilus* の NADH oxidase が働いていると推定され、その欠失株を作製して検討を行った結果、単菌および共生発酵は著しく阻害され、ヨーグルト発酵における溶存酸素消費は主に *S. thermophilus* の NADH oxidase が担うことを見出した³⁾。

□ *S. thermophilus*の溶存酸素消費能が決め手と成るヨーグルト発酵

次に我々は *L. bulgaricus* 3株と *S. thermophilus* 7

株を組み合わせた21通りの共生培養時の発酵時間とこれら単菌培養の発酵時間を調べた結果、共生発酵時間は *S. thermophilus* の発酵時間に依存することを見出した。しかも *S. thermophilus* の発酵時間はその溶存酸素消費速度に反比例し、溶存酸素消費速度と *S. thermophilus* の培地へのギ酸排出量は高い相関を示した。さらに *S. thermophilus* 7株中6株において NADH oxidase 活性が高い株では溶存酸素消費速度が速いという関係が認められた。すなわち、ヨーグルト発酵における発酵促進には *S. thermophilus* の NADH oxidase などによる溶存酸素消費をバックにしたギ酸の生産量が極めて重要であることが判明した。今後は NADH oxidase の発現調節やそれ以外の酸素消費メカニズムの探索などを行う。

□ 双方に必要な共生因子の発見：*S. thermophilus*のウレアーゼ

S. thermophilus のウレアーゼが共生発酵に必要であるという報告と、排出するアンモニアによる緩衝効果のために発酵を抑制するという相反する報告があり、ウレアーゼの共生への寄与については評価が分かれていた。我々は工場においても使用されている窒素曝気法¹⁾（予め溶存酸素を窒素曝気によって取り除くヨーグルト発酵法）について研究しており、当方法によってヨーグルト（共生）発酵および *S. thermophilus* 単菌発酵も同様促進された。ところが8株中半分の *L. bulgaricus* では窒素曝気に拠る発酵遅延が認められたため調べたところ、それらの株は生育に二酸化炭素を要求することが判明した。そこで二酸化炭素の

供与源と推定された *S. thermophilus* のウレアーゼの欠失株を作製し様々な検討を行なった結果、ウレアーゼは二酸化炭素を要求する *L. bulgaricus* にとって重要な生育因子であるばかりでなく、*S. thermophilus* 自身のアンモニア供給源としてアミノ酸合成に必須であることが示され、ウレアーゼが両菌にとって重要な共生因子であると結論された。

□ ゲノム解析から見える“共生”

ここ10年の間に詳細なゲノム情報が明らかになり、両菌がヨーグルトのスターターとして選抜を重ねられた長い歴史の中で、いかにミルクに適合して進化してきたか、共生することによってゲノム自体が変化してきたかが明らかになりつつある。まず両菌ともに、グルコースよりもラクトースを優先して利用し、いわゆるカタボライト抑制が起こらない。また、両菌

ともにミルク培地からのペプチド・アミノ酸輸送体をコードする遺伝子群が多く、アミノ酸合成系の遺伝子の多くが偽遺伝子化するなどして不完全であり、ゲノムの縮小化という進化が進行している。さらに葉酸代謝やポリアミン代謝に関しては不完全な代謝系を両菌が補いあってそれらの生産を可能にしている。以上のようにゲノム解析から、それぞれが役割分担をして両菌があたかも“ひとつの菌”として振る舞い、ゲノムを小さくすることによってミルク中でのより速い発酵（増殖）を可能にしていることが示唆されている。

また二成分制御系による両菌同士の認識メカニズムも報告されており、今後更なる共生因子の探索を含め、共生の全容解明が期待される。

- 1) Horiuchi H. 等2009. J Dairy Sci. 92: 4112.
- 2) Horiuchi H, Sasaki Y. 2012. J Dairy Sci. 95: 2904.
- 3) Sasaki Y 等2014. BMFH. 33: 31